

Aus der Urologischen Klinik mit Poliklinik
der
Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. A. Sigel

Oxalsäure im menschlichen Urin

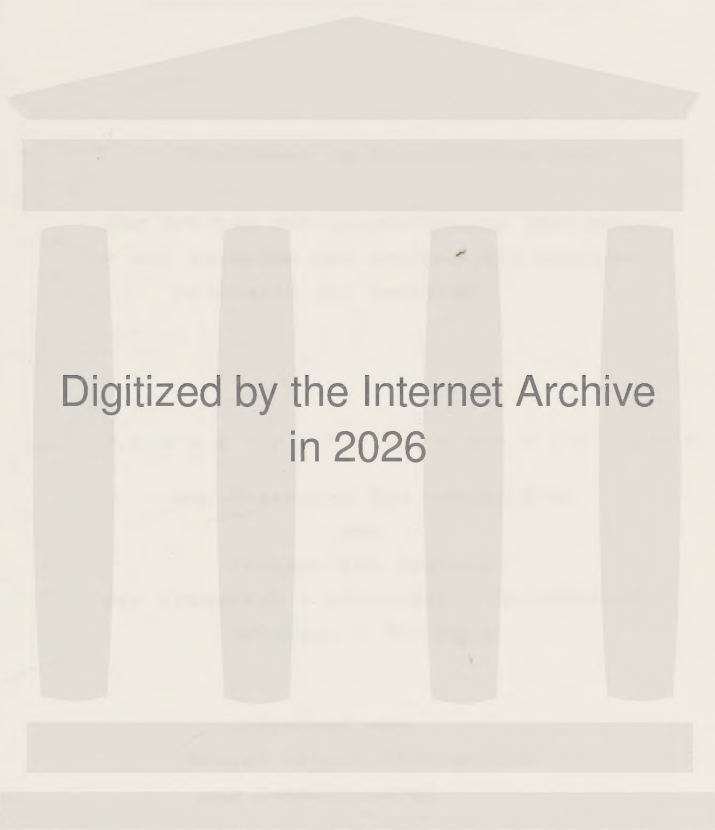
Ein Beitrag zur enzymatischen Bestimmung
bei Gesunden und Kranken mit Calcium-
Lithiasis der Harnwege

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
dem

Fachbereich Medizin
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Erhard Albert Stubenrauch
aus Lendershausen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Urologischen Klinik mit Poliklinik
der
Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. A. Sigel

Oxalsäure im menschlichen Urin

Ein Beitrag zur enzymatischen Bestimmung
bei Gesunden und Kranken mit Calcium-
Lithiasis der Harnwege

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
dem

Fachbereich Medizin
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Erhard Albert Stubenrauch
aus Lendershausen

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereiches Medizin
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. P. O. Schwille
Korreferent: Prof. Dr. A. Sigel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.1.1976

Mein Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Dr. Schwille für die Betreuung während der Durchführung der Experimente sowie die Beratung beim Abfassen der Arbeit.

Ich darf mich ebenso bedanken bei den Mitarbeitern des Hormon- und Stoffwechsel-Labors der Urologischen Klinik, insbesondere bei Frau Schwille und Frau Keiling.

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
Einführung	1
I. Allgemeine Ausführungen	
A. Biologische Bedeutung exogener und endogener Oxalsäure	
1. Physiologie und Chemie	2
2. Geschichte	3
3. Oxalsäure in der Nahrung	4
4. Stoffwechsel der Oxalsäure	6
5. Oxalsäure im Urin	7
B. Kritik der verfügbaren Bestimmungsmethoden .	10
II. Eigene Untersuchungen	
A. Problemstellung	11
B. Patientengut	12
C. Enzymatische Bestimmungsmethode mit der Oxalsäure-Decarboxylase und dem Warburg- Manometer	15
D. Ergebnisse	
1. Abhängigkeit der Reaktion von der angebotenen Enzymmenge	18
2. Einfluß von EDTA auf die Wieder- findungsrate	18
3. Richtigkeit der Bestimmung	19
4. Einfluß der Lagerungsdauer des Urins	20
5. Oxalsäure-Bestimmung im 24-Stunden-Urin	20
6. Einfluß einer Glucagon-Injektion auf die Urin-Oxalsäure bei Gesunden	21

III. Diskussion

A. Diskussion der eigenen Ergebnisse ..	25
B. Kritik der enzymatischen Bestimmungsmethode	28
C. Aussagen zur Pathophysiologie der Calcium-Lithiasis sowie zu Störungen des Oxalsäure-Stoffwechsels	29
IV. Zusammenfassung	32
V. Literatur	34
VI. Lebenslauf	38

Einführung

Calcium-Oxalat ist das häufigste Mineral in Konkrementen der ableitenden Harnwege des Menschen. Obwohl menschlicher Urin unter durchschnittlichen diätetischen Bedingungen eine an Calcium-Oxalat gesättigte Lösung darstellt, ist über die Ursachen der Verschiebung des Calcium-Oxalat-Produktes in den metastabilen Bereich mit nachfolgender Kristallisation und Steinbildung wenig bekannt.

Der Urin Steinkranker enthält im Vergleich zu nach Alter und Geschlecht zugeordneten Vergleichspersonen mehr an Calcium und evt. auch an Oxalat (1), relativ weniger Magnesium, jedoch gleichviel anorganisches Pyrophosphat wie der Gesunde (2).

Von einigen gastrointestinalen Hormonen ist eine renale Wirkungskomponente bekannt geworden (3, 4, 5).

Diätetische Probleme der Wohlstandsernährung in allen westlichen Populationen stehen im Vordergrund des ärztlichen Interesses bei der Aufklärung der Ätiologie der Harnsteinkrankheit. Es liegt daher nahe, auch hormonale Faktoren des Gastrointestinaltraktes als Vermittlersubstanzen bei der Verschiebung der wichtigen Ionenprodukte im Urin Steinkranker in Erwägung zu ziehen. Bevor radioimmunologisch meßbare Serumkonzentrationen dieser Substanzen als Arbeitsgrundlage in der Harnsteinpathophysiologie herangezogen werden, sollte bekannt sein, ob Hormone des Verdauungstraktes in pharmakologischen Dosen solche Verschiebungen zustande bringen.

I. Allgemeine Ausführungen

A. Biologische Bedeutung exogener und endogener Oxalsäure

1. Physiologie und Chemie

Oxalsäure $\begin{smallmatrix} \text{COOH} \\ \text{COOH} \end{smallmatrix}$ ist eine organische Dicarbonsäure, die ubiquitär (insbesondere im Pflanzenreich) vorkommt. Seit mehr als hundert Jahren weiß man um die Existenz der Oxalsäure im Gewebe und in den Körperflüssigkeiten der Säugetiere. Eine exakte Kenntnis des Oxalsäure-Stoffwechsels wurde jedoch durch das Fehlen zuverlässiger analytischer Methoden (vor allem für die Bestimmung im Blut) verhindert.

Oxalsäure kristallisiert aus wässrigen Lösungen als das weiße Dihydrat. Auch das Monohydrat und das Trihydrat (selten) kommen vor. Oxalsäure ist eine relativ starke Säure: $\text{pK}_1 = 1,23$; $\text{pK}_2 = 4,19$. Sie ist in Wasser schlecht löslich (8,7 g in 100 ml Wasser bei 20°C). In Gegenwart von Zink und HCl wird sie reduziert zu Glyoxylsäure bzw. zu Glykosäure. Oxalsäure bildet lösliche Salze mit Alkali-Metall-Ionen (Li, Na, K) und mit Fe-Salzen. Alle anderen Oxalate sind schlecht in Wasser löslich. Mit Calcium bildet Oxalsäure bei neutralem oder alkalischem pH ein nahezu unlösliches Salz (0,67 mg in 100 ml Wasser bei 13°C und pH 7,0). In wässrigen Lösungen ist die Löslichkeit von Calcium-Oxalat erhöht in Gegenwart von Harnstoff und verschiedenen Ionen (Citrat und Magnesium, in geringem Maß auch Lactat, K, Na, Sulfat). Niedrige Konzentrationen von anorganischem Pyrophosphat hemmen den Ausfall von Calcium-Oxalat in wässrigen Lösungen.

2. Geschichte

Oxalsäure, früher auch Kleesäure oder Zuckersäure genannt, wurde 1769 von WIEGLEB als besondere, im Sauerkleesalz enthaltende Säure erkannt.

1773 gewann SAVARY die Oxalsäure aus dem Kalium-Oxalat.

1776 synthetisierte BERGMANN die Oxalsäure durch Oxydation von Zucker mit Salpetersäure ("Zuckersäure").

1781 wies BERGMANN das Vorkommen der Oxalsäure im Organismus nach.

1787 zeigte BRUGNATELLE ihr Auftreten in Blasensteinen und Urin.

1808 veröffentlichte BRANDIS seine "Symptomatologie der Oxalurie". Der Begriff Oxalurie wurde eingeführt, um das Vorkommen exzessiver Mengen von Calcium-Oxalat-Kristallen im Urin zu beschreiben (wie auch erhöhte Oxalsäure-Ausscheidung im Urin überhaupt).

1823 PROUT : "Untersuchung über Wesen und Behandlung des Harngrießes".

1843 sprach PROUT in "Krankheiten des Magens und der Harnorgane" von einer "Oxalsäure-Diathese", von der noch lange in der Harnstein-Literatur die Rede sein sollte und die in Beziehung zu den verschiedensten Krankheitsbildern gesetzt wurde. Die damals aufgestellten Theorien sind heute größtenteils verlassen.

Zwischen 1850 und 1870 lieferte sich die Fachwelt (Forscher wie MITSCHERLICH, PIOTROWSKY, BUCHHEIM) Gefechte um die Frage, ob Oxalsäure im Blut toxisch sei und eine Obturation der Lungenarterien bewirken könne. BUCHHEIM meinte, 14 % der zugeführten Oxalsäure würden über die Nieren ausgeschieden, der Rest werde verbrannt.

Eine Reihe deutscher Forscher beschäftigte sich gegen Ende des vorigen Jahrhunderts mit Oxalsäure-Vergiftungen. ROBERT und KÜSSNER berichteten über die Auswirkungen von toxischen Mengen Oxalsäure auf das ZNS und andere Organe: Blutdruckabfall, Arrhythmie, Bradykardie, Atmungsverlangsamung.

In den ersten Jahrzehnten dieses Jahrhunderts konzentrierte sich die Harnstein- (und damit auch die Oxalsäure-) Forschung auf die Rolle der Elektrolyte Calcium, Magnesium, anorganisches Phosphat. Mc CARRISON sah die Harnsteinbildung als eine Störung im Mineralhaushalt, als das Endprodukt eines vielschichtigen und sehr komplexen Krankheitsbildes an. Als auffälligstes Merkmal beim Steinleiden stellte Mc CARRISON eine Hypercalciurie (ein bis zwei Drittel aller Oxalatsteinträger) fest.

ROBERTSON und NORDIN konstatierten, daß Hypercalciurie niemals alleiniger Faktor zur Steinbildung ist. Greta HAMMARSTEN fand zwischen 1929 und 1937 Beziehungen zwischen Oxalat und Magnesium. Sie entdeckte, daß Mg-Oxalat zehn Mal besser löslich ist als Ca-Oxalat. In der Folgezeit wurde auch die Bedeutung der Spurenelemente in der Harnstein-Ätiologie stärker berücksichtigt.

3. Oxalsäure in der Nahrung

Über die Höhe der täglichen Oxalatzufuhr sind die Forscher sich bei weitem nicht einig. ALBUQUERQUE und TUMA sind der Meinung, die exogene Zufuhr von Oxalsäure spiele, wenn überhaupt, nur eine geringe Rolle bei der Entstehung von Ca-Oxalat-Steinen. Sie sind überzeugt, der Großteil des im Urin gefundenen Oxalates sei endogenen

Ursprungs; Ca-Oxalat werde als unlösliches Salz aus der Nahrung gar nicht erst aufgenommen. ARCHER wie auch HODGKINSON halten die exogene Zufuhr für wichtiger. Sie berechneten in ausgedehnten Studien den Gehalt vieler Nahrungsmittel (insbesondere pflanzlicher Art) an Oxalat (vgl. Tab. 1). Freilich kommen sie zu sehr verschiedenen Ergebnissen: Während nämlich ARCHER die tägliche Oxalsäure-Zufuhr mit 850-980 mg angibt, spricht HODGKINSON von Werten zwischen 70 und 150 mg/Tag. HODGKINSON erklärt die weiten Differenzen mit teilweise erheblichen methodischen Fehlern bei der Bestimmung.

Besonders wichtig ist (nach HODGKINSON) der Gehalt der Nahrung an Oxalsäure dann, wenn diese Nahrung gleichzeitig arm an Calcium ist. So kam es nach dem I. Weltkrieg in Osteuropa zu einer Harnstein-Welle, da neben den (oxalat-reichen) Gemüsen nur sehr wenig (Calcium-haltige) Milchprodukte zur Verfügung standen. Dadurch konnte wesentlich mehr (freies) Oxalat aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert werden.

ARCHER ist der Meinung, nur 2-5 % der angebotenen Oxalat-Menge werde im Darm resorbiert. Dabei werde Na-Oxalat wesentlich besser aufgenommen als Ca-Oxalat. JÜHRGENS schrieb 1932, er glaube, daß 80 % der zugeführten Oxalsäure von Darmbakterien zerstört würden.

Tab. 1 Die höchsten Konzentrationen an Oxalsäure werden erreicht in folgenden Pflanzen (nach HODGKINSON):

	mg/100 g Frischgewicht
Rote Rüben	121
Petersilie	166
Spinat	458 - 780 (jahreszeitliche
Rhabarber	460 - 620 Unterschiede)
Kakao	623
Tee	1.450

4. Stoffwechsel der Oxalsäure

Zahlreiche Autoren beschrieben seit Beginn dieses Jahrhunderts eine Entstehung endogener Oxalsäure. LOMMEL beobachtete bereits 1899, daß erwachsene Probanden auch nach zwölf Tagen Milchdiät noch immer Oxalsäure ausschieden. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Hunderversuche (JÜHRGENS und SPEHR), wobei auch nach sechstägigem Fasten noch Oxalsäure gefunden wurde.

HODGKINSON nannte folgende Quellen der Oxalsäure:

35-44 % aus Ascorbinsäure (in der Nahrung)

40 % von Glycin über Glyoxylsäure

20 % von Glykolsäure, Hydroxyprolin, Tryptophan und
möglicherweise von Purinen.

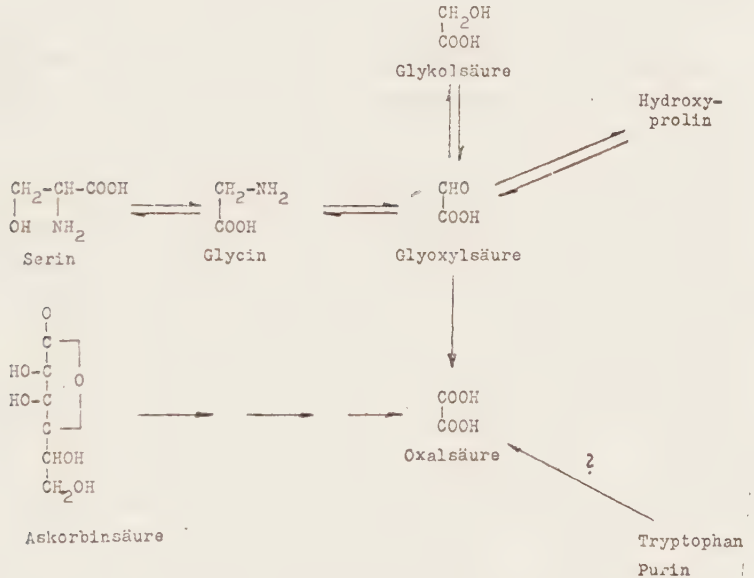
BOURKE schrieb 1975, es habe den Anschein, daß Oxalsäure ein nutzloses Endprodukt des KH-Stoffwechsels sei.

Nach HODGKINSON gibt es keinen Beweis für die Annahme, daß Oxalsäure im Säugetier-Organismus utilized werde.

Mit Isotopen gekennzeichnetes Oxalat, bei Ratten injiziert, wird im Urin unverändert ausgeschieden.

Faeces, CO_2 der Atemluft wie auch Hippursäure im Urin sind nicht signifikant gekennzeichnet. Bei gesunden Probanden wurden 88-99 % der intravenös verabreichten ^{14}C - Oxalsäure im Urin innerhalb von 36 Stunden wiedergefunden. Es ist jedoch möglich, daß eine kleine Fraktion von endogenem Oxalat mit Galle und Magensaft sezerniert wird (mit nachfolgendem bakteriellem Abbau im Darmlumen).

Abb. 1 Stoffwechsel der Oxalsäure
(modifiziert nach Hodgkinson)



5. Oxalsäure im Urin

Oxalsäure ist ein ganz normaler Bestandteil des Blutes (0,2 g im gesamten Organismus) und wird ständig mit dem Urin ausgeschieden. Beim Abkühlen fällt Oxalsäure in der charakteristischen Briefkuvertform aus. WIRTH und Mitarbeiter fanden, daß die tägliche Ausscheidung von Oxalsäure im Bereich von 10 bis 40 mg liege. Auch DEMPSEY (11)

und HODGKINSON (16) gaben diese Werte an. Das ständige Absinken der Normalwerte seit Beginn dieses Jahrhunderts wird mit der Verfeinerung der Bestimmungsmethoden begründet. Eine Zusammenstellung von Oxalsäure-Werten aus der Literatur zeigt Tab. 2.

ZAREMBSKI und HODGKINSON (31) fanden, daß zwar keine Geschlechtsunterschiede, wohl aber Altersunterschiede bei der Oxalsäure - Exkretion zu verzeichnen seien. HODGKINSON et al. (16) machten 1968 folgende Beobachtung: Nach einer Mahlzeit steigt die Oxalsäure-Exkretion an (Maximum nach drei Stunden).

Die Oxalsäure-Ausscheidung ist während des Tages höher als in der Nacht. Von Säure- oder Alkali-Zufuhr ist die Ausscheidungsrate unberührt. HODGKINSON (16) beobachtete eine direkte Beziehung zwischen der Urin-Ausscheidung von Calcium und Oxalsäure (Ausnahme: Patienten mit Primärer Hyperoxalurie, die eine niedrige Calcium-Exkretion haben). Personen mit einer täglichen Exkretion von weniger als 100 mg Calcium schieden weniger als 20 mg Oxalsäure aus. Bei Patienten mit einer täglichen Exkretion von mehr als 300 mg Calcium überstieg die Oxalsäure-Ausscheidung 40 mg/Tag. Calcium-Gluconat-Infusionen erhöhen die Oxalat-Exkretion um das Zehnfache, die Calcium-Ausscheidung um das Doppelte.

Die Hälfte des Urin-Calciums scheint ionisiert vorzuliegen. Der Rest ist an Magnesium und andere Kationen gebunden. Eine kleine Menge Oxalsäure scheint an Urin-Proteine und -Peptide gebunden zu sein. Der Urin ist normalerweise in Bezug auf Ca-Oxalat übersättigt (vgl. Abschnitt Ca-Oxalat-Lithiasis).

CATELL (19) schloß aus den Ergebnissen seiner Hundeversuche, Oxalsäure werde durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion ausgeschieden und durch passive Rück-Diffusion

reabsorbiert. HODGKINSON meinte, der größte Teil der in den Glomeruli mit dem Primärharn filtrierten Oxalsäure werde bereits in den Tubuli rückresorbiert. Bezüglich der Befunde erhöhter und verminderter Ausscheidung von Oxalsäure im Urin wird auf Seite 27 verwiesen.

DEMPSEY und FORBES (11) fanden die höchsten Oxalsäure-Werte bei Oxalose- und Leber-Cirrhose-Patienten (bis zu 400 und 500 mg/Tag). Unterschiedliche Ergebnisse wurden bei Ca-Oxalat-Stein-Patienten gefunden: NORDIN und ROBERTSON (20), PAUN et al. und REVUSOVA (14) fanden signifikant höhere Oxalat-Ausscheidungen bei diesen Patienten. DEMPSEY und FORBES (11), MAYER et al. (9) wie auch wir konnten diese Zusammenhänge nicht bestätigen.

Tab. 2 Normalbereiche der täglichen Oxalsäure-Ausscheidung (modifiziert und ergänzt nach HODGKINSON/WILLIAMS)

Autor		Mittelwert (mg/24 h)	Bereich (mg)	Standard- Abweichung
Dempsey		31,0	15,0 - 50	9,0
Hockaday		29,4	18 - 47	
Takasaki			12,6 - 50,8	
Hodgkinson	männl.	22,7	12,5 - 39,9	
	weibl.	19	8,2 - 37,6	
	Kinder unter 12 J.	14,5	5,0 - 20,9	
Gibbs und Watts		33	24 - 49	
		35	21 - 44	
	Kinder	40	30 - 47	
Hodgkinson u. Williams	"	38	28 - 56	
		30,9	17 - 43	
		30,7	24 - 46	
	Kinder	20,3	13 - 27	
	"	16,9	7 - 36	
Albuquerque	männl.	22,7	11,2 - 35,7	
	weibl.	17,8	14,4 - 20,3	
Archer			9 - 39	7,0
Mayer et al.	ges. Probanden	20,5		7,9
	Harnstein-Pat.	23,5		9,7
Ribeiro	ges. Probanden		17,4 - 41,3	
Zaremboski u. Hodgkinson			9,0 - 28,5	
Nordin u. Robertson			7 - 37	19,0
Flaschenträger u. Müller			31 - 40	

B. Kritik der verfügbaren Bestimmungsmethoden

Diese bereiten seit der Entdeckung der Oxalsäure besondere Schwierigkeiten.

MERZ und MAUGHERI beschrieben 1931 folgenden Nachweis: Direkte Präzipitation der Oxalsäure als Calcium-Salz. Titration des aufgelösten Präzipitats mit Kalium-Permanganat sowie Präzipitation der Proteine mit Trichlor-essigsäure. Diese Methode wurde verschiedentlich variiert, z.B. folgendermaßen: Oxalat wird aus kleinen Urinmengen mit genau gleichen Quantitäten von Äther extrahiert. Nach Entfernung des Äthers wird die Oxalsäure durch 10-prozentiges CaCl_2 als Salz aus einer mit Essigsäure angesäuerten Lösung in 60-prozentigem Alkohol präzipitiert und mit Permanganat nach der jodometrischen Methode titriert.

Kolorimetrische Methoden wurden zur Erhöhung der Spezifität eingeführt. Von HODGKINSON (15) wird folgende Methode als spezifisch angesehen: Reduktion von Oxalsäure zu Glyoxylsäure, anschließende Reaktion mit Resorcinol. Bei dem beschriebenen Vorgehen ist eine Bestimmung der Oxalsäure auch im Plasma möglich.

MAYER et al. (9) beschrieben eine enzymatische Methode. Dabei wird Oxalsäure stöchiometrisch in Ameisensäure und CO_2 umgewandelt. Das freigesetzte CO_2 wird in einem Warburg-Manometer exakt gemessen. Erforderlich für die Katalyse der Reaktion ist das Ferment Oxalsäure-Decarboxylase. RIBEIRO modifizierte die enzymatische Bestimmungsmethode insofern, als er an die Stelle der Präzipitation als Calcium-Oxalat eine Konzentration des Urins mittels Verdampfung setzte.

Eine exakte, freilich nur gut ausgestatteten Zentren vorbehaltene Methode der Bestimmung von Oxalsäure ist die

Isotopen-Methode, die von HOCKADAY (24) sowie von DEAN und GRIFFIN angegeben wurde.

In der gegenwärtigen klinischen Biochemie müßte die Methode mit der besten Aussagekraft von einer kompetitiven Proteinbindungsbestimmung oder einer radioimmunologischen Technik repräsentiert werden.

Die Methoden, die sich auf Präzipitation und anschließen-
de oxidimetrische Titration stützen, bieten Fehlerquellen aus verschiedenen Gründen. So können z.B. andere organische Säuren mitgemessen werden. Die Methode nach POWERS und LEVANTIN könnte, wie MAYER glaubt, die Oxalsäure-Exkretion bei Patienten mit einer Infektion überschätzen. Die Äther-Extraktionsmethode anzuwenden ist sinnvoll, wenn man eine große Anzahl von Proben hat. Bei dieser Prozedur scheint Citrat zu stören. Der modernen Isotopen-Methode fehlen vergleichbare Daten aus verschiedenen Laboratorien, so daß eine kritische Stellungnahme derzeit noch nicht möglich ist.

II. Eigene Untersuchungen

A. Problemstellung

Bei der Suche nach einer für unser Labor geeigneten Bestimmungsmethode erschien uns die von MAYER (9) und RIBEIRO (22) beschriebene enzymatische Methode mit dem Warburg-Manometer geeignet. Der Kostenfaktor (neben Manometer und Zeitaufwand vor allem das Enzym) mußte in erträglichem Rahmen bleiben, weshalb wir den Enzymaufwand verringern wollten. Der Einfluß von EDTA mußte überprüft

werden. Wir hatten uns auch von der Genauigkeit der verwendeten Methode in Standard- und Wiederauffindungsversuchen zu überzeugen. Hinweise auf Veränderungen der nachgewiesenen Urin-Oxalsäure-Menge bei längerer Lagerung des Urins waren zu überprüfen. In einer ausführlichen Studie ermittelten wir die tägliche Oxalsäure-Ausscheidung von 63 Personen, die in vier Gruppen eingeteilt waren. Schließlich versuchten wir herauszufinden, ob eine quantitativ exakt definierte Glucagon-Injektion Einfluß auf die Oxalsäure-Exkretion bei Gesunden haben könnte.

B. Patientengut

1. Prüfung des 24-Stunden-Urins auf Oxalsäure

Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Studie entweder harnsteinkrank, oder ein akutes Harnstein-Ereignis lag nicht länger als zwölf Monate zurück. Sie standen unter der Beobachtung des Mineralstoffwechsel-Labors der Urologischen Klinik. Bei 25 Patienten lag eine Calcium-Lithiasis vor. Die mineralogische Steinanalyse zeigte in allen Fällen Calcium, bei der Mehrzahl einen Oxalat-Anteil. Ihr Urin-Ionogramm unter einer durchschnittlichen deutschen Hausmannskost war bekannt: Fast immer bestand mäßige Hypercalciurie, normale Phosphaturie, häufig eine relative (d.h. bezogen auf Urin-Calcium) Hypomagnesiurie. Keiner der Patienten war zum Zeitpunkt der Untersuchung verdächtig auf Primären Hyperparathyreoidismus oder entwickelte diese Krankheit kurzfristig danach. Bei weiteren zehn Patienten lag eine Harnsäure-Lithiasis vor. Alle zeigten intermittierende oder permanente Säurestärke des Urins (pH 5,0 - 5,6). In der Steinanalyse fand sich immer reine Harn-

säure. Das Urin-Ionogramm war in der Regel unauffällig. Als Vergleichsgruppe dienten 19 gesunde Studenten (Alter 20 bis 30 Jahre) sowie neun gesunde Probanden (Alter 30 bis 60 Jahre) ohne familiäre Prädisposition für Harnsteinkrankheit. Zur Untersuchung verwendeten wir die 24-Stunden-Sammelurine. Die Bestimmung ist im Abschnitt "Bestimmungsmethode" detailliert beschrieben.

2. Untersuchungen des Einflusses einer Glucagon-Injektion auf die Exkretionsrate von Oxalsäure und verwandter Parameter im Urin

Zehn gesunde Studenten (männlich = 7, weiblich = 3) stellten sich zur Verfügung. In der Familienanamnese gab es keine Hinweise auf Diabetes mellitus, Hochdruck, familiäre Prädisposition für Harnsteinkrankheit oder Tumorbildungen. Die Untersuchung wurde nach einer 12- bis 15-stündigen nächtlichen Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz ab morgens acht Uhr durchgeführt: Unter mäßiger Diurese (Zufuhr von koffeinfreiem, ungesüßtem Tee) wurde eine endogene Creatinin-Clearance über zwei Stunden derart vorgenommen, daß einer ca. einstündigen Kontrollperiode mit anschließender Glucagon-Injektion drei Nachlaufperioden von 15, 15 und 30 Minuten gegenüberstand. Der Urin wurde in allen Fällen durch spontane Miktion entleert. Glucagon wurde in Form des handelsüblichen Präparates (Lilly) in einer Dosis von $5 \mu\text{g/kg KGW}$ als Schußinjektion intravenös verabreicht. Unter Berücksichtigung der Glucagon-HWZ von 12 - 20 Minuten entspricht eine derartige Dosis während der ersten 15-Minuten-Nachlaufperiode einer Serumkonzentration von näherungsweise 30 ng/ml , wenn 75 kg KGW zugrundegelegt werden. Dies ist eine ca. 60-fach höhere Plasma-Glucagon-Konzentration als sie unter

den Bedingungen einer Insulin-Hypoglykämie in vivo bzw. unter pathologischen Bedingungen (Stress-Situationen und glucagonbildende Tumoren) beobachtet wird.

Auswertung

Ausgewertet wurden folgende Parameter:

Die glomeruläre Filtrationsrate (endogene Creatinin-Clearance), Urin-pH, Urin- Calcium, -Magnesium, -Phosphat, -Harnsäure und -Oxalat.

Die Exkretionsraten dieser Substanzen wurden auf $1,73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche bezogen und in den Ergebnissen die filtratbezogene Exkretionsrate angegeben.

Analysen

Der pH-Wert wurde elektrometrisch, Kreatinin nach BONNESS und TAUSKY (6) gemessen, Calcium und Magnesium mittels Atomabsorptionsphotometrie, Phosphat nach CHEN und TORIBARA (7), Harnsäure mit der modifizierten Uricase-Katalase-Reaktion nach KAGEYAMA (8).

Statistische Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, repräsentieren die Werte Mittelwerte ± 1 SEM. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels des t-Testes für gepaarte Daten. Regressionsanalysen wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet (Datensystem "Algo-tronic", Fa. Diehl, Nürnberg).

C. Enzymatische Bestimmungsmethode mit der Oxalsäure-Decarboxylase und dem Warburg-Manometer

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir eine 1957 von SHIMAZONO und HAYAISHI sowie 1963 von MAYER beschriebene enzymatische Methode. Die aus dem Holzfäulnis-Pilz *Collybia velutipes* gewonnene Oxalsäure-Decarboxylase katalysiert die stöchiometrische Reaktion von Oxalsäure zu Ameisensäure und Kohlendioxyd.



Der Hauptvorteil dieses Vorgehens liegt in der völligen Spezifität für Oxalsäure. Das Enzym bezogen wir in gefriergetrockneten Quantitäten von 3-5 Einheiten von der New Yorker Firma Worthington. Die Enzym-Lösung kann bei -15°C in 0,02 M K-Acetat-Puffer bei pH 4,5 bis zu drei Wochen aufgehoben werden.

Definition der Einheit U :

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die die Bildung von 1,0 μmol Kalium-Oxalat zu CO_2 in 1 Minute katalysiert.

Vorbehandlung des Urins

Ein 40 ml aliquot des am Morgen abgegebenen 24-Stunden-Sammelurins wird (nach Filtration) bei einem pH von 5,0 bis 5,2 durch die Zugabe von 2,0 ml 5% CaCl_2 gefällt. Danach wird die Probe bis zum Abend bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Am Abend wird die Probe zentrifugiert (bei 2.400 rpm, 0°C für 30 Minuten). Der Überstand wird sorgfältig mit einer Wasserstrahlpumpe abge-

zogen. Das Präzipitat wird nicht gewaschen, da dies zu Verlusten führen könnte, sondern mit 10 ml 0,1 M K-Citrat-Puffer (pH 3,2) aufgelöst. Dieser Vorgang dauert eine Stunde bei mildem Erwärmen des aufgelösten Präzipitats in einem Wasserbad von 70 - 80° C. Das Volumen wird anschließend zu 10 ml ergänzt.

Durchführung der Bestimmung

Ein 2,0 ml aliquot der so erhaltenen 10-ml-Lösung wird in eine Warburg-Fläschchen eingegeben, in dem sich außerdem noch befinden: K-Citrat, EDTA, Enzym-Präparation (im Seitenarm). Genaue Angaben vgl. Tab.9, S.17.

Jeder Versuch besteht aus einer Probe (die doppelt, evt. sogar dreifach läuft, um eine größere Genauigkeit zu erreichen; als Ergebnis wird der Mittelwert herangezogen), einem Standard (1-3 μ Mol K-Oxalat; pH 3,0) und einem Fläschchen, das sowohl Probe als auch Standard enthält (Wiederfindung). Außerdem ließen wir einen Leerwert mitlaufen (= sämtliche Reagentien, jedoch ohne Enzym), da sich herausstellte, daß auch ohne enzymatische Reaktion eine gewisse Gasbildung stattfindet. Der Leerwert wurde abgezogen.

Die Reaktionsflaschen werden in Eis gehalten, bis sie am Manometer befestigt und in das Wasserbad gebracht werden. Nach zehn Minuten werden die Manometer geschlossen. Anschließend wird durch Kippen des Gefäßes die Enzymlösung in den Hauptraum der Warburg-Flasche gebracht, die Reaktion beginnt. In Abständen von fünf Minuten wird die Gasentwicklung bis zum Ende der Reaktion (ca. eine Stunde) abgelesen.

Berechnung

Die Konzentration der Oxalsäure im Urin läßt sich nach Angabe von MAYER et al. (9) folgendermaßen berechnen:

$$\frac{\text{mg (Ox)}}{24 \text{ h}} = \frac{\mu\text{M CO}_2 \times \text{Mol.Gew. (Ox)} \times \text{Total-Vol. (24 h)}}{10 \times \text{Wiederfindung (\%)} \times \text{Vol. aliquot (=40 ml)}}$$

Tab.9 : Reagentien für die Bestimmung von Oxalsäure
im Warburg-Manometer

	Urin-Proben	Recovery	Leerwert
1,0 M K-Citrat	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
6,0 μ M EDTA	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
1,0 μ M K-Oxalat	--	0,1 ml	--
Urin	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Wasser	0,4 ml	0,3 ml	0,5 ml
Enzym (0,1 U)	0,1 ml	0,1 ml	--
gesamt	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml

Störfaktoren

MAYER et al. (9) berichteten über ihre Versuche mit Substanzen, die die enzymatische Reaktion eventuell stören könnten. Glucuronsäure hatte bis zu einer Konzentration von 50 μ M in 3 ml keinen störenden Einfluß. Harnsäure (schlechte Löslichkeit bei pH 5,2) hatte bis zu 15 mg keine bemerkenswerten Auswirkungen. Phosphate werden zusammen mit Ca-Oxalat präzipitiert und verzögern in hohen Konzentrationen (30 mg Phosphat) die Reaktion, verhindern sie aber nicht. Physiologische Mengen von Pb und Cu sowie Harnstoff und Dextrose beeinflussen den Recovery nicht. Da MAYER feststellte, daß geringe Zusätze von EDTA das Wiederfinden von Oxalsäure im Urin wesentlich verbesserte und ein Optimum bei Zugabe von 6 μ M EDTA gefunden wurde, stimmten wir unseren Analysengang von vornherein darauf ab. HODGKINSON und ZAREMBSKI (17) verwiesen darauf, daß Eisen im destillierten Wasser einen Fehler in der Oxalat-Bestimmung bewirken könnte. Wir verwendeten entionisiertes Wasser.

D. Ergebnisse

1. Abhängigkeit der Reaktion von der angebotenen Enzymmenge

Wir bemühten uns (vor allem der enormen Kosten wegen), den Enzym-Verbrauch in einen Bereich zwischen Optimum und Minimum zu senken. Die Ergebnisse der vergleichenden Versuche sind in Tab. 3 aufgezeigt.

Tab. 3 Einfluß des Enzymangebots auf die gefundene Menge Oxalsäure im Urin

A. Reaktionsdauer : 40 Minuten

Vorgelegte Enzymmenge (Einheiten)	Vorgelegte Oxalsäure-Menge (μMol)	CO ₂ errechnet (μl)	CO ₂ wiedergefunden (μl)	Wiederfindung (%)
0,3 - 0,5	2	44,8	40,2	89,7
0,3 - 0,5	5	112	109,8	98,0
0,1 - 0,166	2	44,8	45,0	100,4
0,1 - 0,166	5	112	111,0	99,1
0,075 - 0,125	2	44,8	44,4	99,1
0,06 - 0,1	2	44,8	48,0	107,1
0,05 - 0,083	2	44,8	45,0	100,4

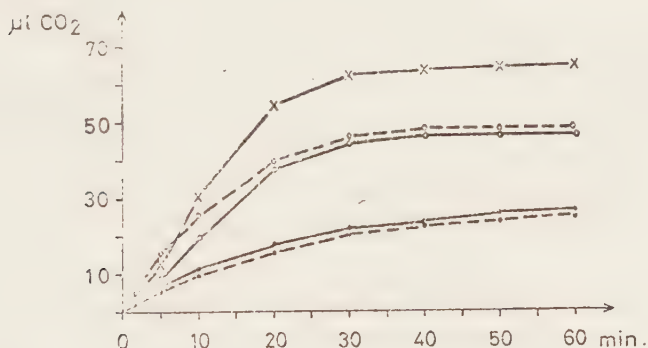
B. Reaktionsdauer : 60 Minuten

0,3 - 0,5	2	44,8	42	93,7
0,3 - 0,5	5	112	111,6	99,6
0,1 - 0,166	2	44,8	45,6	101,7
0,1 - 0,166	5	112	114	101,7
0,075 - 0,125	2	44,8	45,6	101,7
0,06 - 0,1	2	44,8	48	107,1
0,05 - 0,08	2	44,8	46,8	104,4

2. Einfluß von EDTA auf die Wiederfindungsrate

Bei unseren Versuchen zeigte sich, daß EDTA wohl im Urin (MAYER), nicht aber in wäßriger Lösung einen Einfluß auf die Wiederfindung von definierten Mengen Oxalsäure hat. Dies ist in Abb. 2 dargestellt.

Abb. 2 Auffinden definierter Mengen Oxalsäure (ausgefüllter Kreis = 1 μ Mol Oxalsäure; offener Kreis = 2 μ Mol; Kreuz = 3 μ Mol) mit EDTA (durchgezogene Linie) und EDTA (gestrichelte Linie)



3. Richtigkeit der Bestimmung

In mehreren Versuchen prüften wir die Präzision der enzymatischen Bestimmungsmethode nach. In Tab. 4 sind die Ergebnisse übersichtlich aufgezeigt.

Tab. 4 Auffinden definierter Mengen Oxalsäure in wäßriger Lösung

Vorgelegte Menge Oxalsäure (μ Mol)	Vorgelegte Menge Oxalsäure-Decarboxylase (Einheiten)	Wiederfindung (%)	Abweichung vom durchschnittlichen Recovery
10	0,3 - 0,5	104,2	- 2,06
10	0,6 - 1,0	98,5	- 4,76
1	0,3 - 0,5	112,5	+ 0,23
2	0,6 - 1,0	100,5	- 2,76
1	0,3 - 1,5	104,4	+ 1,13
2	0,6 - 0,5	103,9	+ 0,63
3	0,9 - 1,0	103,6	+ 0,3
1	0,3 - 0,5	91,9	- 11,36
2	0,6 - 1,0	109,4	+ 6,13
3	0,9 - 1,0	112	+ 8,23
1	0,3 - 1,5	102,5	- 0,76
2	0,6 - 1,0	114,8	+ 11,52
1	0,3 - 0,5	93	- 10,26
2	0,6 - 1,0	98	- 5,26
1	0,3 - 0,5	109,8	+ 6,63
3	0,9 - 1,5	108,4	+ 3,13
1	0,3 - 1,5	103,3	+ 2,03
2	0,6 - 1,0	83	- 20,26
1	0,3 - 1,0	112,5	+ 0,23
1	0,3 - 0,5	100,1	- 3,16

n = 20

Durchschnittlicher Recovery 103,26

s = 6,06

4. Präzision der Methode und Einfluß der Lagerungsdauer des Urins

Bei einigen wenigen Versuchen konnten wir feststellen, daß (wie in Tab. 5 dargestellt) der Oxalsäuregehalt des Urins bei Lagerung ansteigt. Der Variationskoeffizient (VK) in der Serie ($n = 6$ und 7) liegt bei 24 Stunden Lagerungsdauer mit 19,30 bzw. 11,0 relativ hoch. Er verbessert sich erheblich nach Lagerungsdauer von 72 bzw. 120 Stunden. Die Werte liegen damit in jener Größenordnung, die von enzymatischen und radioimmunologischen Bestimmungen allgemein bekannt sind.

Tab. 5 Einfluß der Lagerungsdauer des Urins auf den Oxalsäuregehalt

Versuch A	Dauer	Anzahl	$\bar{x}$	s	SEM	VK (%)
	24 h	6	16,20	3,128	1,182	19.30
	120 h	7	20,28	2,440	0,922	12.0
Versuch B	24 h	6	14,18	1,556	0,635	11.0
	72 h	4	22,28	2,081	1,040	9.3

5. Oxalsäure-Bestimmung im 24-Stunden-Urin

Wir teilten 63 Personen in vier Gruppen ein: Probanden 20-30 Jahre, Probanden 30-60 Jahre, Calcium-Lithiasis-Patienten, Harnsäure-Stein-Patienten. Die Ergebnisse sind in den Tab. 6 und 7 dargestellt.

Wir fanden Oxalsäure-Exkretionsraten im 24-Stunden-Urin von durchschnittlich 16,2 mg bis 25,3 mg bei einer Standardabweichung von 4,55 bis 8,84 mg. Die Wiederfindungsrate lag (als Grundlage dienen die Durchschnittswerte der einzelnen Gruppen) zwischen 89,9 und 98,28 Prozent. Als

Mittelwert der Oxalsäure-Ausscheidung sämtlicher 63 Personen errechneten wir 20,06 mg/Tag (Standardabweichung = 7,098 mg).

Tab. 6 Oxalsäure-Bestimmung im 24-Stunden-Sammelurin bei 63 Personen

	Anzahl	Mittelwert (mg)	1 Standardabweichung	Wiederfindung %
Gesunde Probanden 20-30 J.	19	19,23	8,84	89,9
Gesunde Probanden 30-60 J.	9	16,20	6,89	95,0
Calcium-Stein-Patienten	25	20,0	6,87	98,3
Harnsäure-Stein-Patienten	10	25,30	4,55	96,9
Gesamt:	63			95,1

Tab. 7 Übersicht der Oxalsäure-Ausscheidung von 63 Personen

	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	40-45 mg/Tag
Gesunde Probanden 20-30 J.	4	5	3	2	1	1	2	1
Gesunde Probanden 30-60 J.	3	1	3	1	0	1	0	0
Calcium-Stein-Patienten	3	3	9	2	5	2	0	1
Harnsäure-Stein-Patienten	0	2	2	1	1	2	2	0
Gesamtzahl (Personen)	10	11	17	6	7	6	4	2

6. Einfluß einer Glucagon-Injektion auf die Urin-Oxalsäure bei Gesunden

Die Exkretionsrate im Urin

Alle für die Interpretation der renalen Glucagon-Wirkung wichtigen Daten sind in Abb. 3 dargestellt. Einige davon decken sich mit den Ergebnissen der Arbeiten früherer Autoren, andere nicht.

So wurde bisher regelmäßig über eine vermehrte Ausscheidung von H^+ -Ionen beim Menschen unter Glucagon berichtet (10), während die vorliegende Studie einen Anstieg des Urin-pH aufweist.

Die glomeruläre Filtrationsrate

Die Abb. 3 zeigt weiterhin, daß die Ausscheidung von Kreatinin sich nur unwesentlich oder nicht ändert. Werden Urin-mineralien und -harnsäure auf die Einheit funktionierender Nephronen (100 ml Filtrationsrate) bezogen, hat Glucagon auf alle vier Urinbestandteile einen nachhaltigen Effekt.

Urin-Oxalsäure

Ihr Verhalten ist nach Glucagon-Injektion uneinheitlich, d.h. einem initialen Anstieg folgt ein starker Abfall mit Umkehreffekt. Bei allen Versuchspersonen wird während der ersten 15-minütigen Clearance-Periode ein Diuresezuwachs von ca. 150 - 200 % beobachtet (nicht dargestellt).

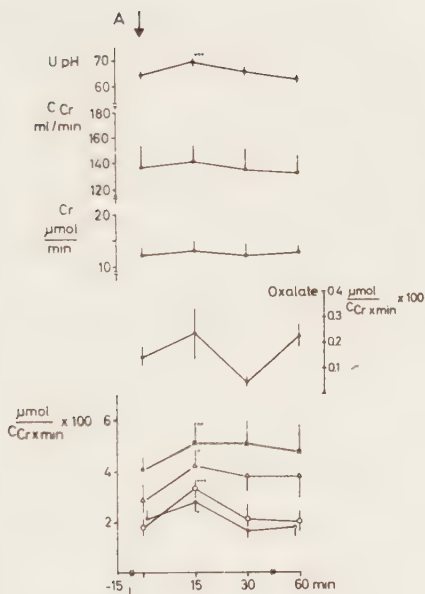


Abb. 3 Wirkung einer i.v.-Bolusinjektion von kristallinem Glucagon ($5 \mu\text{g/kg KGW}$) bei Gesunden ($n=10$) auf für die Konkrementbildung wesentliche Kenngrößen der Nieren und des Urins.

↓ : Injektion
 • : p 0,05; ** : p 0,01; *** : p 0,005
 ○ Calcium; ● Magnesium; ■ Phosphat;
 ▲ Harnsäure

Tab. 8 Verhalten der einfachen Konzentrationsprodukte ($\log (\mu\text{Mol/l})^2$) von Calcium-, Magnesium-Oxalat und Calcium-Phosphat im Urin von gesunden Probanden nach i.v.-Applikation von 5 $\mu\text{g/kg}$ Glucagon (Lilly). Mittelwerte $\pm$ 1 SEM. () Anzahl der Probanden. K = vor Inj., und 15, 30, 60 Minuten nach Injektion.

$\log (\mu\text{Mol/l})^2$	K	15	30	60
Calcium x Oxalat	4,129 0,128 (10)	4,298 ^x 0,083 (10)	4,151 0,189 (7)	3,952 0,081 (9)
Magnesium x Oxalat	4,182 0,095 (10)	4,230 0,075 (10)	3,991 0,158 (7)	3,933 0,103 (9)
Calcium x Phosphat	5,682 0,180 (10)	5,792 0,168 (10)	5,966 0,266 (8)	5,310 0,137 (9)

^x : p 0,10

Die Darstellung zeigt, daß die Produkte für Calcium-Oxalat und Magnesium-Oxalat bei Gesunden gleich groß ist, was mit der lange bekannten Konkurrenz beider Kationen um die Bindungsstellen am Oxalation in Ein-

klang steht. Nur das Produkt Calcium x Oxalat erreicht nach 15 Minuten einen näherungsweise signifikanten Unterschied gegenüber dem Ausgangswert (K) ($p = 0,10$). Das Calcium-Phosphat-Produkt erreicht um die 30. Minute einen Höchstwert. Aus einer Parallelstudie ergab sich, daß dieses Produkt basal (vor Glucagon-Belastung) stärker von der Calcium- als von der Oxalat-Konzentration abhängt (37). Nach Glucagon-Injektion läßt sich kein rechnerischer Zusammenhang mehr nachweisen, d.h. Calcium- und/oder Oxalat-Konzentration ändern sich nicht oder völlig unabhängig voneinander.

III. Diskussion

A. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Der bei Harnsteinerkrankungen häufig vernachlässigte Faktor ist die Oxalsäure, meist wegen fehlender Möglichkeiten der Bestimmung. MAYER (9) und RIBEIRO (22) beschrieben die von ihnen verwendete Methode der enzymatischen Bestimmung von Oxalsäure im Urin als übersichtlich und rationell. Neben der in unserem Stoffwechsel-Labor durchgeführten diagnostischen Erfassung von Mineralstoffwechselstörungen bemühten wir uns um eine für die tägliche Praxis eines klinischen Labors geeignete Methode, die uns in die Lage versetzen sollte, den Faktor Oxalsäure speziell im Hinblick auf Diagnostik und Therapie der Harnstein-Erkrankung exakt einkalkulieren zu können. Wenn die Ergebnisse von NORDIN und ROBERTSON (20) sowie REVUSOVA et al. (14) richtig sein sollten insofern, daß Harnsteinkranke oder zur Harnsteinbildung disponierte Personen eine erhöhte Oxalat-Ausscheidung im Urin haben, dann wäre eine leicht durchführbare, zuverlässige Bestimmungsmethode für die klinische Routine auch in kleineren

Labors von ganz besonderer Bedeutung. Wir versuchten bei unserer Arbeit, Vor- und Nachteile der enzymatischen Bestimmung der Oxalsäure im Urin mit dem Warburg-Manometer herauszufinden. Zudem wollten wir einen Beitrag leisten zur Beantwortung der Frage, ob bei bestimmten Patienten-Kollektiven (insbesondere bei Calcium-Oxalat-Lithiasis-Patienten) eine Erhöhung der Oxalsäure-Exkretion nachzuweisen ist.

MAYER et al. wie auch RIBEIRO, die das Enzym selbst präparierten, arbeiteten mit sehr hohen Enzymkonzentrationen. Wegen der enormen Kosten suchten wir den Fermentverbrauch wesentlich einzuschränken. Es gelang uns, den Enzymeinsatz bei einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 99,1 bis 101,4 % auf ein Zehntel der ursprünglich angegebenen Menge zu reduzieren. Erhöhter Einsatz von Enzym bedingt letztlich nicht eine höhere, sondern lediglich eine raschere Gasentwicklung.

Wir führten zahlreiche Versuche durch, bei denen wir versuchten, exakt vorgegebene Mengen von Oxalat mit definierten Enzym-Konzentrationen wiederzufinden. Es zeigte sich, daß unsere Auffindungsraten im Bereich von 83 bis 114,8 % lagen. Der durchschnittliche Recovery lag in dieser Versuchsserie ($n = 20$) bei 103,26 % mit einer Standardabweichung von $s = 6,067$. RIBEIRO wie auch MAYER beschreiben ähnliche Ergebnisse. Da MAYER über einen Anstieg des Oxalsäuregehaltes bei längerer Lagerung des Urins berichtete, überprüften wir in einigen Versuchen diese Aussage. Für die Praxis ist es sehr wichtig zu wissen, wie lange biologisches Material gelagert werden darf. Wir verzeichneten nach 72 Stunden sogar einen höheren Anstieg als nach 120 Stunden; die Anzahl der Versuche war jedoch für eine verbindliche Aus-

sage nicht groß genug. Ohne die Ergebnisse ätiologisch exakt deuten zu können, konnten wir die Beobachtung MAYER's also bestätigen.

Wenn man Mittelwerte, Streubreite und Standardabweichung unserer Ergebnisse der Oxalsäure-Messung im Sammelurin von 63 Personen mit den Angaben in der Literatur vergleicht, so sieht man, daß sie in einem Bereich liegen, den z.B. HODGKINSON, ZAREMBSKI, ALBUQUERQUE, MAYER und andere Autoren als Normalbereich ansehen, während mehrere Autoren höhere Werte angeben. Einige Autoren berichten über erhöhte Oxalsäure-Exkretionsraten bei Calcium-Oxalat-Lithiasis-Patienten (14,11). Bei unseren Untersuchungen ließ sich ein derartiger Sachverhalt nicht nachweisen. Dagegen lagen die Ausscheidungsraten bei der Gruppe der Harnsäure-Lithiasis-Patienten höher als bei den drei anderen Gruppen.

Die Studie zeigt eindeutig, daß Glucagon als ein phosphaturisches, calciurisches, magnesiurisches und passager oxalurisches Prinzip bei Gesunden akzeptiert werden sollte. Bei der Bewertung der Bedeutung für die Pathophysiologie der Urolithiasis allgemein und beim Menschen im besonderen müssen jedoch Vorbehalte gemacht werden. Zunächst muß davon ausgegangen werden, daß die durch Bolusinjektion erreichbaren Konzentrationen der Hormons Glucagon in der peripheren Blutbahn pharmakologische Dosisbereiche erreichen, während die Nüchternkonzentration beim Menschen zwischen 40 und 180 pg/ml liegt. Vergleichbar hohe Konzentrationen wie in dieser Studie werden nur bei Vorliegen von Glucagon-produzierenden Tumoren erreicht, die bisher selten beschrieben wurden. Über Einzelheiten berichtete WISSMÜLLER (37).

B. Kritik der enzymatischen Oxalsäure-Bestimmung mit dem Warburg-Manometer

Die Bestimmung der Urin-Oxalsäure mit Hilfe der Oxalsäure-Decarboxylase entspricht dem modernen Trend zu qualitativ wie quantitativ exakten enzymatischen Bestimmungsmethoden, wie sie aus der täglichen medizinischen Praxis nicht mehr wegzudenken sind. Das von HAYASHI 1957 erstmals gewonnene, von MAYER und RIBEIRO überprüfte Enzym decarboxyliert spezifisch Oxalsäure. Die manometrische Methode ist sehr temperaturempfindlich. Das Gerät selbst muß in gleichbleibend temperiertem Raum stehen; es darf insbesondere kein Luftzug entstehen; Öffnen einer Türe z.B. kann den Wert verfälschen.

Die Bearbeitungszeit des Urins (Ultrafiltration, Versetzen mit CaCl_2 und Abstellen im Kühlschrank) ist mit etwa einer halben bis zu einer Stunde anzusetzen. Die eigentliche manometrische Untersuchung dauert (einschließlich der Vorbereitung von Urin, Geräten und Enzym-Lösungen) etwa vier bis sechs Stunden. Sie erfordert exaktes Arbeiten (Einpipettieren, genaue Buchführung etc.) und erhebliche Konzentration, was an die Qualifikation einer MTA enorme Anforderungen stellt. Die Haltbarkeit des Enzyms ist auf drei Wochen begrenzt; es muß also in dieser Zeit aufgebraucht werden. Mit einem Fläschchen gefriergetrockneten Enzyms ist es möglich, drei bis vier Urine auf ihren Oxalsäuregehalt zu untersuchen. Das Enzym muß aus den USA bezogen werden.

Es wäre günstig, eine größere Menge Urin (z.B. 100 ml) zentrifugieren und das in dieser Probe enthaltene Oxalat extra-

hieren zu können. Die auftretenden, z.T. unvermeidlichen Meßfehler würden kleiner, die der Gesamtfehler der Methode ebenfalls.

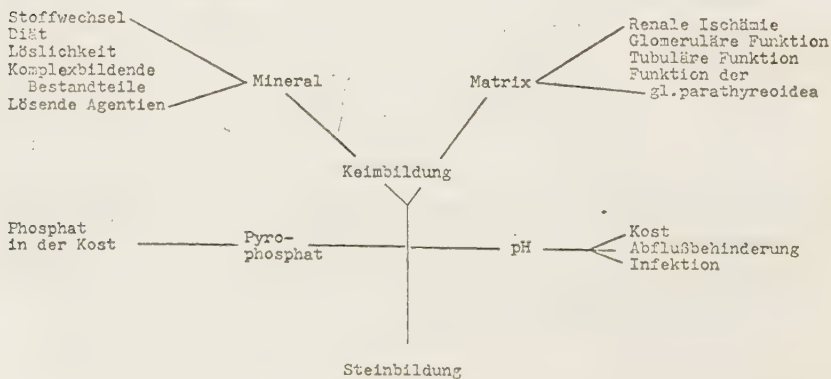
C. Aussagen zur Pathophysiologie der Calcium-Lithiasis sowie zu Störungen des Oxalsäure-Stoffwechsels

Calcium-Oxalat ist der Hauptbestandteil der Harnsteine in den westlichen Ländern und kommt in 65 - 75 % aller Steine vor. Einige Steine bestehen vollständig aus Calcium-Oxalat, die Mehrzahl allerdings gemischt mit Apatit, wobei Ca-Oxalat die Hauptkomponente in über der Hälfte aller Steine darstellt. Ca-Oxalat-Steine bilden sich gewöhnlich in sterilem Urin. Es ist ungewöhnlich, Ca-Oxalat-Steine und Magnesium-Ammonium-Steine zusammen anzutreffen, da letztere in infiziertem Urin entstehen (38).

Die meisten Harnstein-Patienten haben eine ganz normale Ausscheidung von Oxalsäure, was wir bei Calciumstein-Patienten bestätigen konnten (Tab. 6). In Einzelfällen ist die Oxalsäure-Exkretion erhöht, besonders in Fällen mit Hypercalciurie (12). Bestimmungen der Ionenprodukte haben ergeben, daß der Urin normalerweise in Bezug auf Calcium-Oxalat übersättigt ist (da Urin-Calcium und möglicherweise auch Oxalat gering erhöht sind). Die meisten Urine sind in der "metastabilen Phase", unabhängig davon, ob es sich um Normalpersonen oder Steinträger handelt (16). REVUSOVA (14) fand eine deutlich erhöhte Oxalsäure-Exkretion bei Patienten mit Ca-Oxalat-Steinen, führt eine Bildung von Harnsteinen aber vor allem auf intermittierend hohe Schübe an Oxalat und nicht auf einen kontinuierlich hohen Spiegel zurück. Die Oxalat-Ausscheidung variierte bei verschiedenen Kontrollen derselben Patienten sehr stark (besonders bei Patienten mit Primärer Hyperoxalurie).

Die einzigen Kristalle, die man in frischem Urin findet, sind Ca-Oxalat-Kristalle. Da es eine Steinbildung in praktisch allen Urinen gibt, stellt sich die Frage, weshalb nicht alle Menschen Steinträger sind (36). Autoren wie PRIEN und WALKER sowie FLEISCH (36) vermuten, daß Glucuronide, anorganisches Pyrophosphat oder Urinpeptide eine Keimbildung oder zumindest ein Steinwachstum inhibieren (36). Damit läßt sich erklären, weshalb es selbst im übersättigten Urin nicht regelmäßig zur Steinbildung kommt. Die augenblickliche Forschung auf diesem Gebiet zielt dahin, die Urinbestandteile so zu verändern, daß das Ca-Oxalat-Produkt reduziert wird. BOURKE und COSTELLO (38) berichteten von einem wesentlichen Unterschied der Kristallbildung im Urin von Gesunden einerseits und Ca-Oxalat-Patienten andererseits: Die Kristalle seien verschieden in ihrer Größe wie auch in ihrer Tendenz zu aggregieren. BOURKE meint, es trete bei Ca-Oxalat-Steinkranken ein Fehlen oder Mangel an Faktoren auf, die eine Kristallbildung im Urin verhindern (ohne daß der Autor die Natur dieser Faktoren präzise nennen kann). Dies scheint (nach BOURKE) der verbreitetste Defekt bei Steinbildnern zu sein (38).

Abb. 4 Schema der Harnsteingenes (nach FLEISCH)



Oxalose

Ablagerungen von Ca-Oxalat können in einer Reihe von Geweben gefunden werden. Gelegentlich sind es Zufallsbefunde post mortem bei Patienten, die keine bekannte Störung des Oxalsäure-Stoffwechsels hatten. Die meisten renalen und extrarenalen Ablagerungen kommen vor bei der Primären Hyperoxalurie, bei Oxalsäure- oder Äthylenglykolvergiftung und (in geringerem Maß) bei Nierenversagen (16). Die Präzipitation des Oxalats in diesen Fällen steht in Beziehung zu einer hohen Blutkonzentration an Oxalsäure und der daraus resultierenden Erhöhung des Ionenproduktes von Ca-Oxalat (20). HOCKADAY nimmt an, daß es zu einer erhöhten Oxalsäure-Bildung im Körper als Folge eines Enzymdefektes kommt (24).

Primäre Hyperoxalurie

Die Primäre Hyperoxalurie ist vererblich, tritt aber selten auf. Sie führt zu Nephrolithiasis und Nephrocalcinosis; es finden sich Ablagerungen in extrarenalen Geweben. Der Tod tritt meist durch Nierenversagen ein. Im Urin sind Oxalsäure und Glykolsäure erhöht. Man nimmt eine Störung im Glyoxyl-Stoffwechsel als Ursache an (17).

Eine Erhöhung der Oxalsäure-Exkretionsrate wurde auch bei Leberkrankheiten und beim Nierenversagen festgestellt. Ferner ist die Oxalsäure im Urin bei Pyridoxin- und Thiamin-Mangel, bei Anaesthesie mit Methoxyfluorane sowie bei Resektion des Ileums erhöht.

Eine Verminderung der Oxalsäure-Ausscheidung findet sich bei Hunger sowie bei einseitiger Ernährung (ohne Gemüse) (39).

Zusammenfassung

1. Das Enzym Oxalsäure-Decarboxylase katalysiert spezifisch Oxalsäure zu Ameisensäure und CO_2 . Das wurde in zahlreichen Versuchen (gekoppelt mit Wiederfindung zugesetzter Oxalsäure) nachgewiesen. CO_2 ist in einem Warburg-Manometer meßbar. Die beschriebene Methode ist geeignet, den Gehalt des Urins an Oxalsäure mit hinreichender Genauigkeit zu messen. Die Methode ist wiederholbar und reproduzierbar. Die Wiederfindungsrate lag bei Werten zwischen 95 und 105 % (im Durchschnitt).
2. Diese Methode ist, zumal da sie für Blut und Plasma ungeeignet erscheint, aus finanziellen und Personalgründen als Routinemethode auch in einem größeren Klinik-Labor zu aufwendig und zu schwierig.
3. In mehreren Versuchen konnten wir zeigen, daß Oxalsäure-Bestimmungen mit hinreichender Sicherheit und Genauigkeit auch mit einem Zehntel der von MAYER (9) und RIBEIRO (22) verwendeten Enzym-Menge durchzuführen sind. Dadurch wurden die Kosten der Untersuchungen entscheidend gesenkt.
4. Lagerung des Urins bedingt einen Anstieg der Oxalsäure (Tab. 5). Es ist daher zu fordern, daß der Urin innerhalb der ersten 24 Stunden zu verarbeiten ist.
5. Es wurden 63 Sammelurine auf ihren Gehalt an Oxalsäure untersucht (vgl. Tab. 6). Bei einer durchschnittlichen Wiederfindungsrate von 95 % errechnete sich eine durch-

schnittliche Oxalat-Exkretion von 20,06 mg/die. Die Standardabweichung betrug 7,10 mg, die Streubreite reichte von 7 bis 43 mg. Die geringste Ausscheidungsrate war bei den 30- bis 60-jährigen gesunden Probanden aufzufinden, die höchste Exkretion bei der Gruppe der Harnsäure-Stein-Patienten. Ca-Oxalat-Stein-Träger lagen im großen und ganzen im Normbereich.

6. Bei einer Versuchsreihe mit zehn gesunden Probanden konnten wir beweisen, daß Glucagon oxalurisch wirkt. Für die initiale Phase der Steinbildung (Kristallitbildung) kann es auf Grund der logarithmischen Konzentrationsprodukte allein nicht verantwortlich sein. Zu keiner Versuchszeit wurde eine signifikante Steigerung dieser Produkte erreicht. Voraussetzung zur Steinbildung ist wahrscheinlich, daß mehrere Faktoren gleichzeitig pathologisch verändert sind.

LITERATUR

1. Hodgkinson, A.
Relations between oxalic acid, calcium, magnesium and creatinine excretion in normal men and male patients with calcium oxalate kidney stones.
Clin. Sci. Mol. Med. 46, 357 - 367, 1974 .
2. Schuille, P.O., Semberger, N.W. and Wach, E. :
Fasting uric acid and phosphate in urine and plasma of renal calcium stone formers.
Nephron, in press 1975 .
3. Pullmann, T.N., Lavender, A.R. and Aho, J. :
Direct effects of Glucagon on renal hemodynamics and excretion of inorganic ions.
Metabolism 16, 358 - 373, 1967 .
4. Rubenstein, A.A., Marco, M.E., and Horwitz, D.L.:
Insulin and the kidney.
Nephron 15, 306 - 326, 1975 .
5. Marchand, G.R., Hubel, K.A. and Williamson, H.E.:
Effects of Secretin on renal hemodynamics and excretion.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. , Volume 139, Number 4,
1350 - 1358, 1973.
6. Bonsness, R.W., and Tausky, H.H.:
On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction.
J. Biol. Chem., 158, 581 - 583, 1945.
7. Chen, R.W., and Toribara, T.Y.:
Microdetermination of phosphorus.
Anal. Chem. 28, 1756 - 1768, 1956 .
8. Kageyama, N.:
A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system.
Clin. chem. Acta 31, 421 - 424, 1971 .
9. Mayer, G.G., Markow, D., and Karp, F.:
Enzymatic oxalate determination in urine.
Clin. Chem. 9, 334 - 339, 1963 .
10. Stowe, N.T., Hook, J.P.:
Role of alterations in renal hemodynamics in the natriuretic action of Glucagon.
Arch. Int. Pharmacodyn. 183, 65 - 74, 1970 .
11. Dempsey, F.F., Forbes, A., Melick, R., and Henneman, Ph.:
Urinary oxalate excretion.
Metabolism 9, 52 - 58, 1960 .

12. Albuquerque, P.F., and Tuma, M.:
Investigations on urolithiasis II. Studies on oxalate.
J. Urol. (Baltimore) 87, 504 - 506, 1961 .
13. Archer, H.E., Dormer, A.E., Scowen, E.F., and Watts, R.W.:
Studies on the urinary excretion of oxalate by normal
subjects.
Clin. Sci. 16, 405 - 411, 1957 .
14. Revusova, V., Zvara, Gratzlova :
Urinary oxalate excretion in patients with urolithiasis .
Urologia int. 26, 277 - 282, 1971.
15. Hodgkinson, A., and Zarembski, P.M.:
The determination of oxalic acid in urine.
Analyst 86, 16 - 21, 1961.
16. Hodgkinson, A., and Zarembski, P.M.:
Oxalic acid metabolism in Man: a review.
Calc. Tiss. Res. 2, 115 - 132, 1968.
17. Hodgkinson, A.:
The urinary excretion of oxalic acid in nephrolithiasis.
Proc. Roy. Soc. Med. 51, 970 - 971, 1958.
18. Atkins, G.L., Dean, Griffin, and Watts :
Quantitative aspects of ascorbic acid metabolism in man.
J. biol. Chem. 239, 2975 - 2980, 1964.
19. Cattell, W.R., Spencer, Taylor, and Watts :
The mechanism of the renal excretion of oxalate in the dog.
Clin. Sci. 22, 43 - 52, 1962.
20. Nordin, B.E.C., and Robertson, W.G.:
Calcium phosphate and oxalate ion products in normal and
stoneforming urines.
Brit. Med. J. 1966 I, 450 - 453.
21. Powers, H.H., and Leventin, P.:
A method for the determination of oxalic acid in urine.
J. biol. Chem. 154, 207 - 214, 1944.
22. Ribeiro, M.E., and Elliot, J.S.:
Direct enzymatic determination of urinary oxalate.
Invest. Urol. 2, 78 - 81, 1964.
23. Hammarsten, G.:
Etiologic factors in renal lithiasis.
Ed: A.J.Butt, p. 89, Springfield III : Ch.C.Thomas, 1956.
24. Hockaday, T.D.R., Clayton, J.E., Frederick, E.W., and
Smith, L.H.:
Primary Hyperoxaluria
Medicine (Baltimore) 43, 315 - 345, 1964.

25. Jeghers, H., and Murphy :
Practical aspects of oxalate metabolism.
N. Engl. J. Med. 233, 208 - 215, 238 - 246, 1945.
26. Jürgens, R. und Spehr, G.:
Zur Physiologie und Pathologie des Oxalsäurestoffwechsels.
Dtsch. Arch. klin. Med. 174, 456 - 467, 1933.
27. Kobert, R., und Küssner, B.:
Die experimentellen Wirkungen der Oxalsäure.
Virchows Arch. path. Anat. 78, 209 - 244, 1879.
28. Lommel, F.:
Über die Herkunft der Oxalsäure im Harn.
Dtsch. Arch. klin. Med. 63, 599 - 611, 1899.
29. Weinhouse, S., and Friedman, B.:
Metabolism of labelled 2-carbon acids in the intact rat.
J. Biol. Chem. 191, 707 - 717, 1951.
30. Wyngaarden, J.B., and Elder, T.D.:
Chapter in : The metabolic basis of inherited disease.
Ed. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson.
P. 189. New York, McGraw-Hill, 1966.
31. Zerembski, P.M., and Hodgkinson, A.:
The determination of oxalic acid in food.
Analyst 87, 698 - 702, 1962.
32. Thomas, W.C., Bird, E.D., and Tomita, A.:
Some concepts concerning the genesis of urinary calculi.
J. Urol. 90, 521 , 1963.
33. Eegriwe, E.:
Reaktionen und Reagentien zum Nachweis organischer
Verbindungen.
Z. anal. Chem. 110, 22 - 25, 1937.
34. Elliot, J.S., and Eusebio, E.:
Calcium oxalate solubility: The effect of inorganic salts,
urea, creatinine and organic acids.
Invest. Urol. 3, 72 - 76, 1965.
35. Elliot, J.S.:
Calcium stones
The difference between oxalate and phosphate types.
J. Urol. (Baltimore) 1968.
36. Fleisch, H.:
Some new concepts on the pathogenesis and the treatment of
urolithiasis.
Urol. int. (Basel) 19, 372 - 389, 1965.

37. Wißmüller, Margot :
Gastrointestinale Hormone, Urin- Mineralien und
- Oxalsäure
Med. Diss. (Erlangen), 1975.
38. Bourke, E.; Costello, J. :
The clinical importance of oxalic acid.
Ir. Med. J., 68, 93 - 96 , 1975
39. Patinakis, Johanna :
Vergiftungen mit Oxalsäure und Äthylenglykol.
Med. Diss. (Erlangen) 1968 .

